



ČOVJEK

(od stanice do organizma)

## STANICA – JEŽEVA KUĆICA

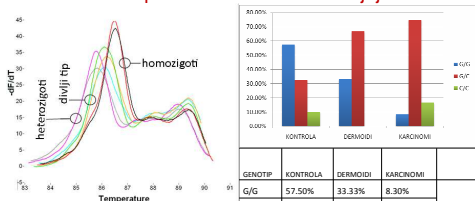
M. Sabol, P. Ozretić, D. Car

Laboratorij za nasljedni rak, Zavod za molekularnu medicinu, IRB



### MUTACIJE I POLIMORFIZMI

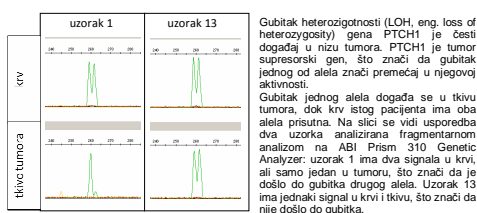
#### PTCH1 polimorfizmi u tumorima jajnika



Metoda: analiza krivulje mekšanja.

Na temelju razlika izgleda krivulje može se zaključiti radi li se o divljem tipu, heterozigotu (jedan alel normalan a drugi promijenjen) ili homozigotu (oba alela promijenjena). Polimorfizam c.2560VSG>C u genu PTCH1 povezan je s tumorima jajnika, s time da je učestalost polimorfizma povećana u tumorima u odnosu na kontrole (zdrave žene koje nikad nisu oboljele od tumora jajnika).

### GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI

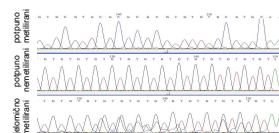


Učestalost LOH u različitim skupinama analiziranih tumora u Laboratoriju za nasljedni rak:

Fibromi jajnika – LOH detektiran u 9,5% uzoraka  
Dermoidi jajnika – LOH detektiran u 50% uzoraka  
Karcinomi jajnika – LOH detektiran u 25% uzoraka  
Bazocelularni karcinomi kože – LOH detektiran u 48,6% uzoraka  
Skvamozni karcinomi kože – LOH detektiran u 53% uzoraka

### METILACIJA

Metilacija je jedan od mehanizama regulacije ekspresije gena. Kod metilacije dolazi do vezanja metilne skupine na bazu citozin u DNA, i to isključivo ako nakon citozina slijedi gvanin. Takvi parovi nazivaju se CpG mjesta, a regije ispred gena koje imaju mnogo takvih mjesta su CpG otoci. U tumorima često dolazi do preterane metilacije CpG otoka, što dovodi do utišavanja ekspresije gena ispred kojeg se otok nalazi.

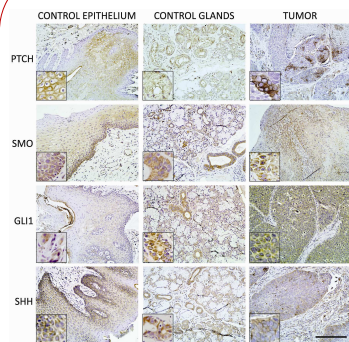


Bioluminif. sekvenciranjem moguće je odrediti jesu li citozini metilirani ili ne. Ako su metilirani na oba alela očitava se samo plavi (C) signal, ako su metilirani na jednom od dva alela očitavaju se plavi (C) i crveni (T) signal, a ako su u potpunosti nemetilirani očitava se samo crveni (T) signal.

Metilacija CpG otoka gena PTCH1

Benigni tumori jajnika – često metilirani (87% fibromi, 70% dermoidi)  
Karcinomi jajnika – nemetilirani  
Bazocelularni karcinomi kože – rijetko metilirani (12%)  
Karcinomi cerviksa – nemetilirani

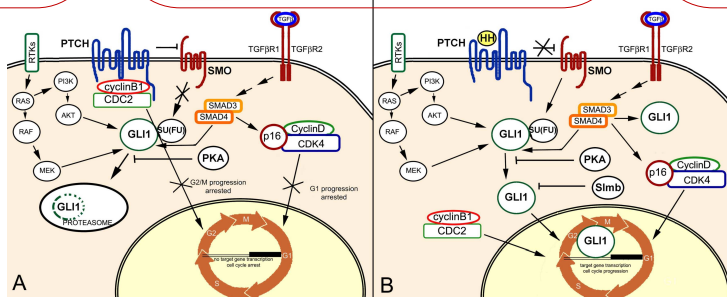
### PROTEINI U TKIVU



Proteini se u tkivu detektiraju imunokemijskim metodama. Smeđe obojenje predstavlja pozitivan signal. Proteini signalnog puta Hh-Gli ne bi trebali biti prisutni u većini zdravih tkiva, međutim u maligno promijenjenim tkivima se vrlo često detektiraju.

Proteinski ekspresiju detektirali smo u nizu različitih tumora:

- Plancelularni tumori glave i vrata
- Tumori debelog crijeva
- Benigni i maligni tumori jajnika (benignio-maligni)
- Melanomi i bazocelularni karcinomi kože

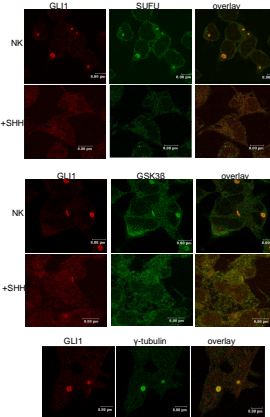


Hedgehog je protein koji u našoj priči ipak ne luta bez staze puta već ima točno određen put: Hedgehog-Gli signalni put. Hedgehog je ligand koji se veže za receptor na površini stanica, Pth, koji u tom trenutku prestaje reprimirati Smo, također transmembranski protein. Smo šalje signal dalje u unutrašnjost stanice. Iako načini prijenosa signala u unutrašnjost nisu još u potpunosti razjašnjeni, poznato je da se iz kompleksa sa SuFu otpušta transkripcijski faktor Gli. Gli se translocira u jezgru gdje potiče ekspresiju gena odgovornih za regulaciju staničnog ciklusa, apoptozu i proliferaciju.

Hedgehog-Gli signalni put ostao je vrlo konzerviran od vinske mušice, u kojoj je i otkriven, pa sve do čovjeka. Kod čovjeka on ima ključnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja, na primjer pri razvoju prstiju. U stanicama zdravog odraslog organizma uglavnom je inaktivan, osim u matičnim stanicama gdje je odgovoran za proliferaciju. Nepravilno funkcioniranje signalnog puta tijekom embrionalnog razvoja dovodi do teških razvojnih malformacija. Nepravilna aktivacija ovog signalnog puta u odraslom organizmu povezana je s razvojem tumora.

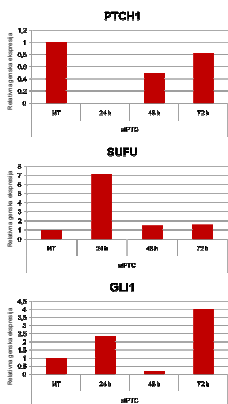
### PROTEINI U STANICI

Proteinima u stanici pratili smo smještaj unutar stanice konfokalnom mikroskopijom (dr. Weber, ZMB), te otkrili kolokalizaciju proteina GLI1, SUFU i GSK3β, što znači da vrlo vjerojatno među njima dolazi do interakcije, i to u području centrosoma.



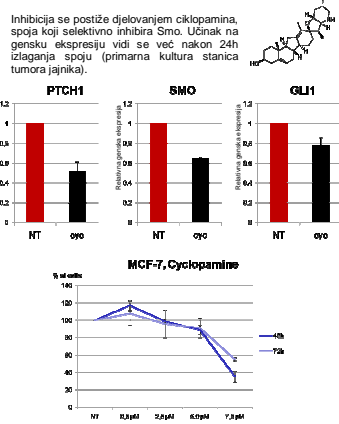
### INHIBICIJA

#### UNUTARNJA



Unutarnja inhibicija postiže se utišavanjem genske ekspresije malim interferirajućim RNA molekulama. Ovdje je prikazan učinak utišavanja gena PTCH1. Nakon 24h njegova ekspresija je nezanemarljiva, što znači da je u potpunosti utišan, a nakon toga se kroz vrijeme polagano vraća. Zanimljivo je da u trenutku utišavanja PTCH1 naglo raste ekspresija gena SUFU i GLI1, što bi značilo da signalni put kompenzira gubitak nastao utišavanjem PTCH1. Ovaj učinak primijećen je na tumorima dojke (na slici), debelom crijeva i jajnika.

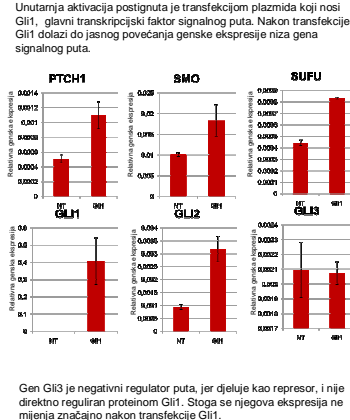
#### VANJSKA



Ciklopamin smanjuje preživljenje stanica, te je ono ovisno o dozi primijenjenog spoja (stanice tumora dojke)

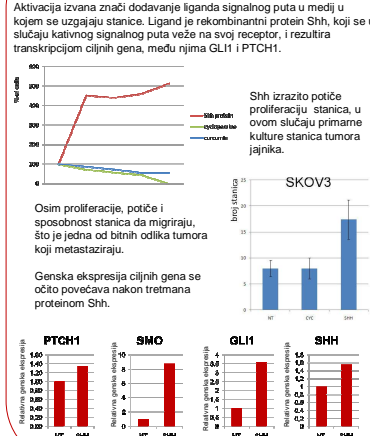
### AKTIVACIJA

#### UNUTARNJA



Gen Gli3 je negativni regulator puta, jer djeluje kao represor, i nije direktno reguliran proteinom Gli1. Stoga se njegova ekspresija ne mijenja značajno nakon transfekcije Gli1.

#### VANJSKA



Osim proliferacije, potiče i sposobnost stanica da migriraju, što je jedna od bitnih odlika tumora koji metastaziraju.

Genska ekspresija ciljnih gena se očito povećava nakon tretmana proteinom Shh.